© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2016
УДК615.371:615.072

Оценка подлинности и стабильности вакцины БЦЖ методом мультиплексной ПЦР

Д. Т. Леви[1], Ю. И. Обухов[1], Н. В. Александрова[1], Р. А. Волкова[1], Е. В. Эльберт[1], М. В. Альварес Фигероа[2], А. В. Прокопенко[2], Р. И. Луданный[2]

[1] *Федеральное государственное бюджетное учреждение «Научный центр экспертизы средств медицинского применения» Министерства здравоохраненияРоссийской Федерации, Москва, Россия*
[2] *Федеральное бюджетное учреждение науки «Центральный научно-исследовательский институт эпидемиологии» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека, Москва, Россия*

Поступила 14.12.2016. Принята к публикации 17.02.2016.

Метод мультиплексной полимеразной цепной реакции использовали для оценки стабильности 7 посевных серий субштамма *Mycobacterium bovis* BCG-1, Россия, применявшихся для изготовления вакцины БЦЖ с 1948 г. по настоящее время. Для ПЦР использованы праймеры, подобранные к 5 участкам области RD и 1 участку повторяющихся элементов межгенной области оперона SenX3-RegX3. Электрофореграммы продуктов амплификации для 7 посевных серий были идентичны и отличалась от электрофореграмм других известных субштаммов БЦЖ, взятых в качестве контроля. Аналогичные результаты получены при генотипировании 32 коммерческих серий вакцины БЦЖ, изготовленных из субштамма *M. bovis* BCG-1, Россия тремя производителями. Полученные данные подтвердили стабильность посевных серий вакцины БЦЖ, использовавшихся более 60 лет, и адекватность принятой системы ведения штамма. Апробированный метод мультиплексной ПЦР с отечественными реактивами может быть принят для подтверждения идентичности посевного материала и вакцины отечественному субштамму БЦЖ (*M. bovis* BCG-1) при выполнении теста «Подлинность». Метод адекватен и воспроизводим.

Ключевые слова: *посевная серия; мультиплексная полимеразная реакция; субштаммы БЦЖ; стабильнось; подлинность.*

Библиографическое описание: *Леви ДТ, Обухов ЮИ, Александрова НВ, Волкова РА, Эльберт ЕВ, Альварес Фигероа МВ, Прокопенко АВ, Луданный РИ. Оценка подлинности и стабильности вакцины БЦЖ методом мультиплексной ПЦР. БИОпрепараты. Профилактика, диагностика, лечение 2016; 16 (1): 49–54.*

Созданный в 1921 году французскими учеными аттенуированный штамм БЦЖ (BCG — Bacillus Calmette-Guerin) был предложен исследователям других стран для производства вакцины против туберкулеза. При изготовлении вакцины БЦЖ производители использовали питательные среды из местного сырья, различные условия и сроки культивирования микобактерий, вносили изменения в технологию получения вакцины. В результате этого дочерние штаммы БЦЖ, которые принято называть субштаммами, различаются между собой по морфологии клеток, антигенному составу, ростовым свойствам, способности вызывать гиперчувствительность замедленного типа (ГЗТ), остаточной вирулентности, от которой зависит реактогенность и защитные свойства вакцины [1, 2]. С 90-х годов прошлого столетия этим различиям между субштаммами БЦЖ уделяется значительное внимание. Исследования, проведенные в последние годы под эгидой ВОЗ, показали, что генетические особенности субштаммов гораздо более выражены. Так, M. A. Behr, P. M. Small [3], исследуя историю происхождения и генетический полиморфизм 13 субштаммов БЦЖ, разделили их на три группы по количеству копий IS6110 и наличию или отсутствию mpt64. Субштаммы BCG-Russia, BCG-Japan, BCG-Moreau, также как и оригинальный штамм BCG, имели 2 копии IS6110 и mpt64. Эта группа штаммов была получена в 1924–1925 гг. Другая группа, потерявшая 1 копию IS6110, была получена в 1925–1926 гг.; в нее вошли BCG-Sweden и BCG-Birkhaug. Штаммы третьей самой многочисленной группы (1926–1931 гг.) потеряли по одной копии IS6110 и mpt64. К ним относится субштамм BCG-Denmark и производные от него (BCG-Prague, BCG-Glaxo), BCG-Phipps, BCG-Tice, BCG-Flappier и производный от него (BCG-Connaught), BCG-Pasteur. Установлено, что генетические изменения БЦЖ произошли вследствие эволюции *in vitro* в период аттенуации *M. bovis* [4–6]. Подобное разнообразие субштаммов показывает насколько важно проводить контроль за штаммом с применением молекулярно-генетических методов не только при производстве или совершенствовании вакцины БЦЖ, но и при создании новых вакцин на ее основе [1, 7, 8].

Всего существует несколько десятков субштаммов БЦЖ. ВОЗ было зарегистрировано 16 субштаммов [9]. Для производства вакцины БЦЖ в мире используется в основном 6 субштаммов БЦЖ: BCG-Moreau, BCG-Denmark (существует несколько вариантов этого субштамма), BCG-Connaught, BCG-Russia, BCG-Japan и BCG-Paster (несколько производителей используют 4 варианта этого субштамма) [5, 7, 10].

В начале 60-х годов прошлого столетия ВОЗ рекомендовала ввести в производство БЦЖ систему посевного материала (seed lot system). В последующем было установлено, что общее число пересевов от начала приготовления посевной серии до получения готового препарата не должно превышать 12 пассажей [10]. Следует подчеркнуть, что наша страна первой (1924 г.) получила *M. bovis* BCG от авторов штамма, первой зафиксировала его свойства как субштамма БЦЖ-1, лиофилизировав в 1940 г. [11, 12]. Проведенные исследования обеспечили разработку и внедрение в практику первой в мире сухой вакцины БЦЖ (1944 г.).

На основании международных коллаборативных исследований, проведенных в 2008–2012 гг., ВОЗ [13] утвер-

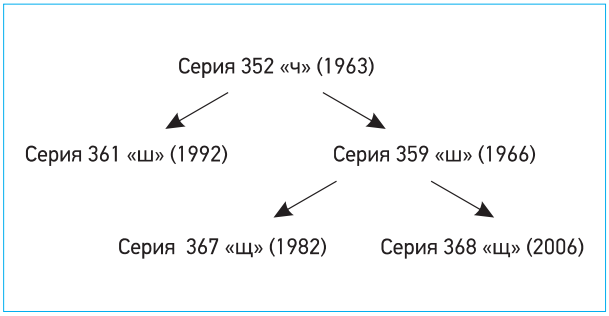

Рис. 1. Схема приготовления посевных серий субштамма БЦЖ-1.

дила 4 референс-субштамма для производства вакцины БЦЖ:

– BCG Vaccine of Tokyo 172 substrain (1st WHO Reference Reagent), NIBSC;

– BCG Vaccine of Danish 1331 substrain (1st WHO Reference Reagent), NIBSC;

– BCG Vaccine of Russian BCG-I substrain (1st WHO Reference Reagent); NIBSC (материал для этого референс-реагента был изготовлен из субштамма *M. bovis* BCG-1, Russia на производстве вакцины БЦЖ Национального центра инфекционных и паразитарных болезней, София, Болгария);

– BCG Vaccine of Moreau-RJ substrain (1st WHO Reference Reagent), NIBSC.

Согласно последним рекомендациям ВОЗ [13], каждая посевная и коммерческая серия вакцины должна быть испытана молекулярно-биологическим методом на подлинность, т.е. на соответствие именно тому штамму, который зарегистрирован в нормативной документации на препарат. Существующие микробиологические методы оценки вакцины по этому показателю недостаточны для подтверждения подлинности субштамма БЦЖ. Разработанные к настоящему времени молекулярно-биологические методы позволяют достаточно быстро подтверждать идентичность вакцины и референс-субштамма, выявить возможные существенные мутации в процессе производства. Несомненно, наиболее информативным является секвенирование материала. Однако в настоящее время этот метод остается достаточно дорогим для рутинного использования. Быстрым экономичным методом является мультиплексная ПЦР с праймерами, позволяющими идентифицировать субштаммы БЦЖ. Метод апробирован в международных испытаниях, проведенных под эгидой ВОЗ [14].

Таблица 1. Последовательность праймеров для мультиплексной ПЦР

Праймер	Последовательность	Регион
ET1	5'AAG CGG TTG CCG CCG ACC GAC C3'	Region of differens 1
ET2	5'CTG GCT ATA TTC CTG GGC CCG G3'	
ET3	5'GAG GCG ATC TGG CGG TTT GGG G3'	
RD2l	5'CCA GAT TCA AAT GTC CGA CC3'	Region of differens 2
RD2r	5'GTG TCA TAG GTG ATT GGC TT3'	
RD8l	5'ACT CCT AGC TTT GCT GTG CGC T3'	Region of differens 8
RD8r	5'GTA CTG CGG GAT TTG CAG GTT C3'	
RD14l	5'CAG GGT TGA AGG AAT GCG TGT C3'	Region of differens 14
RD14r	5'CTG GTA CAC CTG GGG AAT CTG G3'	
RD16l	5'ATC GTT CAC GGA CAG CCG TAG T3'	Region of differens 16
RD16r	5'CTC GAT CCA AGG TCA ACC ACG3'	
C3	5'GCG CGA GAG CCC GAA CTG C3'	SenX3-RegX3
C5	5'GCG CAG CAG AAA CGT CAG C 3'	

В России принято готовить посевную серию вакцины БЦЖ *M. bovis* BCG-1 для использования в течение 10–20 лет. Лиофильно высушенный материал посевной серии хранят при температуре не выше минус 20°С [13], его свойства подтверждают каждые 5 лет. В музее микобактериальных культур ФГБУ «НЦЭСМП» Минздрава России хранятся образцы лиофилизатов субштамма *M. bovis* BCG-1, включая посевные серии от 1947 года сушки по настоящее время.

Приготовленная в 1963 году серия № 352 «ч» была первой посевной серией, предназначенной для производства «сухой» (лиофилизат) вакцины БЦЖ.

Схема приготовления последующих серий посевного материала вакцины БЦЖ представлена на рисунке 1.

По принятой в стране системе идентификации субштамма БЦЖ-1 цифровым номером серии является число пассажей с момента приобретения штамма (т.е. количество пересевов на питательных средах), буквенный номер обозначает число пассажей за указанный период на картофельной среде с бычьей желчью, в скобках — год лиофилизации материала.

Цель исследования: мультиплексная полимеразная цепная реакция как тест подтверждения соответствия посевных и коммерческих серий вакцины БЦЖ субштамму *M. bovis* BCG-1, т.е. подлинности. Метод ПЦР, используемый как рутинный метод контроля подлинности вакцинного штамма BCG, должен быть по возможности недорогим, специфичным, чувствительным, воспроизводимым и надежным. Специфичность метода в основном определяется областью, к которой подобраны праймеры, а также оптимизацией условий проведения ПЦР.

В рамках исследования проводили также оценку стандартности отечественной системы получения посевных серий с 1947 г. по настоящее время. Исследовали генетическую стабильность посевного материала в процессе его хранения при минус 18°С, используя для амплификации известные праймеры.

Материалы и методы

1. Праймеры к 5 областям RD (1, 2, 8, 14 и 16) и к последовательности повторяющихся элементов межгенной области оперона SenX3-RegX3, которая имеет различное количество повторов в субштаммах *M. bovis* BCG, приготовлены ЗАО «Синтол» (табл. 1). Последовательность нуклеотидов одобрена ВОЗ, в том числе для коллаборативных испытаний [6, 7, 14].

2. Праймеры, полученные ФГБУ «НЦЭСМП» Минздрава России из NIBSC для проведения международных коллаборативных испытаний.

3. Референс субштаммы ВОЗ (получены из NIBSC): Russian BCG-I substrain, Tokyo 172 substrain, Moreau-RJ substrain.

4. Субштаммы из коллекции ФГБУ «НЦЭСМП» Минздрава России: *M. bovis* BCG Paster, *M. bovis* BCG Glaxo.

5. Субштамм *M. bovis* BCG-1 (лиофилизаты) для производства жидкой вакцины: БЦЖ генерация 90з (1950), БЦЖ генерация 150м (1954), БЦЖ генерация 44в (1948), БЦЖ генерация 696 (1948).

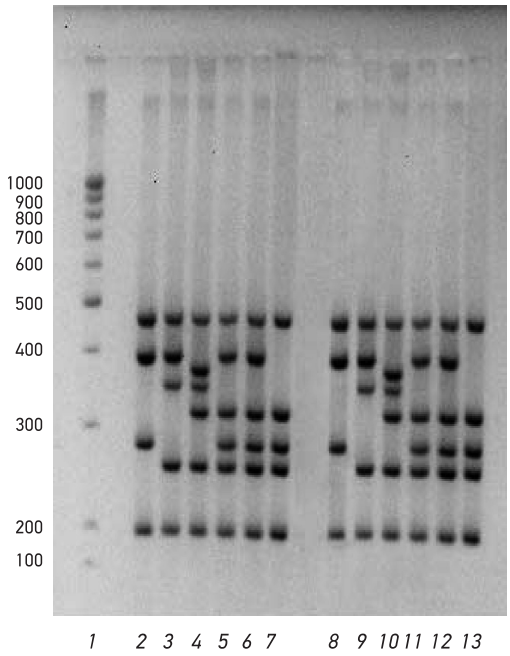

Рис. 2. Результаты мультиплексной ПЦР с праймерами ЗАО «Синтол» (дорожки *2–7*) и с праймерами NIBSC (дорожки *8–13*): *1* — маркер молекулярных масс 100 bp; *2* — субштамм BCG Paster; *3* — субштамм BCG Glaxo; *4* — субштамм BCG Tokyo; *5* — вакцина БЦЖ-М «Микроген» (серия 545 02.2012); *6* — субштамм BCG-1, Россия; *7* — субштамм BCG Moreau RJ; *8* — субштамм BCG Paster; *9* — субштамм BCG Glaxo; *10* — субштамм BCG Tokyo; *11* — вакцина БЦЖ-М «Микроген» (серия 545 02.2012); *12* — субштамм BCG-1, Россия; *13* — субштамм BCG Moreau RJ.

6. Посевные серии для производства (лиофилизаты) вакцины БЦЖ: сер. 367«щ» (1982), сер. 361«ш» (1992), сер. 368«щ» (2006).

7. Коммерческие серии вакцины БЦЖ производства: «НПО Микроген», Ставрополь, Россия; ФГБУ «ФНИЦЭМ им. Н. Ф. Гамалеи» филиал «Медгамал», Москва, Россия; BB-NCIPD, София, Болгария.

Подготовка образцов

Вакцину БЦЖ, лиофилизат в ампулах, ресуспендировали в 1 мл раствора натрия хлорида 0,9%. По 100 мкл полученной суспензии отбирали в пробирки типа Эппендорф для выделения ДНК и исследований методом мультиплексной ПЦР.

Предварительные испытания позволили выбрать отечественные наборы реагентов для подготовки проб и проведения ПЦР:

Выделение ДНК проводили с помощью комплекта реагентов «Рибо-преп» для выделения РНК/ДНК из клинического материала производства ФБУН «ЦНИИЭ» Роспотребнадзора, Россия, серия А22.11.11, в соответствии с Инструкцией по применению.

Амплификацию осуществляли с использованием Набора реагентов для амплификации «GenPak PCR Core» производства компании ООО «Isogene», Россия, кат № U 1010, серия 40212.

Состав смеси для ПЦР (на 1 пробирку): 25 мкл буфера для ПЦР («МастерМикс»), по 2 мкл каждого праймера и по 1 мкл выделенной ДНК. Конечная концентрация ингредиентов в ПЦР-смеси составила:

– дезоксинуклеозидтрифосфатов — 200 мкМ;
– Taq ДНК-полимеразы 1 u;
– магния хлорида — 2,5 мМ;
– праймеры ET1 и ET3 — 0,2 мкМ;
– остальные праймеры — 0,4 мкМ.

Амплификацию проводили на приборе с активным регулированием температуры «Терцик» производства ЗАО «ДНК-Технология», Россия, по программе:

– 94°C — 10 мин (1 цикл);
– 94°C — 1 мин;
– 55°C — 1 мин (30 циклов);
– 72°C — 2 мин;
– 72°C — 10 мин (1 цикл).

Для детекции продуктов амплификации использовали электрофорез в 3% агарозном геле в трис-боратном буфере при 200 В в течение 2 ч (пробег красителя — примерно на 0,5 длины геля). Длина геля — 10 см. В качестве маркера молекулярных масс использовали маркер с шагом 100 bp или 50 bp. На гель наносили по 15 мкл каждого образца.

При проведении валидации метода мультиплексной ПЦР исследовали материал четырех зарубежных субштаммов (BCG Paster, BCG Tokyo, BCG Glaxo, BCG Moreau RJ), посевной серии 361«щ» (1992) субштамма *M. bovis* BCG-1 и приготовленной из нее коммерческой серии вакцины БЦЖ-М производства «НПО «Микроген». Для постановки реакции амплификации использовали праймеры, полученные из NIBS в рамках международных коллаборативных исследований, и праймеры, изготовленные ЗАО «Синтол».

Результаты

Результаты валидации представлены на рисунке 2.

Анализ полученных данных показал, что результаты испытания были равнозначными при использовании для мультиплексной ПЦР праймеров двух независимых изготовителей. С праймерами ЗАО «Синтол» ампликоны посевной серии 361«щ» и коммерческой серии вакцины БЦЖ были идентичны между собой и отличались от картины амплификации зарубежных субштаммов. Ампликоны зарубежных субштаммов различались между собой в соответствии с составом их ДНК. Картина, полученная с использованием праймеров производства «Синтол», была аналогична результатам, полученным с референтными праймерами (NIBSC). Такие же результаты получены при постановке мультиплексной ПЦР в рамках данного исследования сотрудниками ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора, Москва. Анализ данных литературы также подтвердил, что полученные при анализе референтных субштаммов БЦЖ результаты (ампликоны и их размеры) соответствовали результатам, опубликованным другими исследователями [6, 10, 14].

Проведенный валидационный анализ мультиплексной ПЦР с 5 известными субштаммами БЦЖ показал, что метод мультиплексной ПЦР с праймерами, приготовленными фирмой ЗАО «Синтол», является пригодным для проведения дальнейших исследований. Метод адекватен и воспроизводим.

Мультиплексная ПЦР была применена для изучения стабильности отечественного субштамма путем постановки реакции амплификации с ДНК, выделенной из штаммов БЦЖ, лиофилизированных за период с 1948 по 2006 гг. На рисунке 3 представлена электрофореграмма

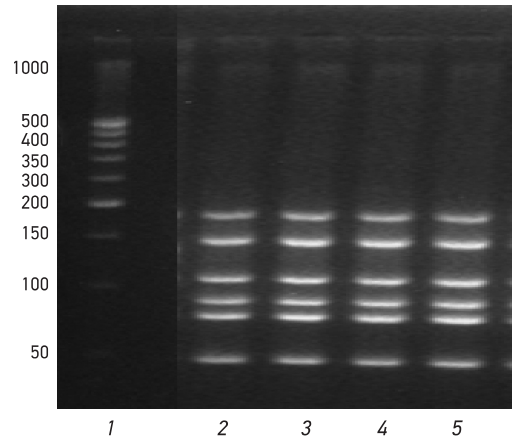

Рис. 3. Электрофореграмма продуктов амплификации при анализе лиофилизатов БЦЖ 1948–1954 гг. Исследуемый материал нанесен по схеме: *1* — маркер молекулярных масс 100 bp; *2* — лиофилизат БЦЖ генерация 90з (1950); *3* — лиофилизат БЦЖ генерация 150м (1954); *4* — лиофилизат БЦЖ генерация 44в (1948); *5* — лиофилизат БЦЖ генерация 69б (1948).

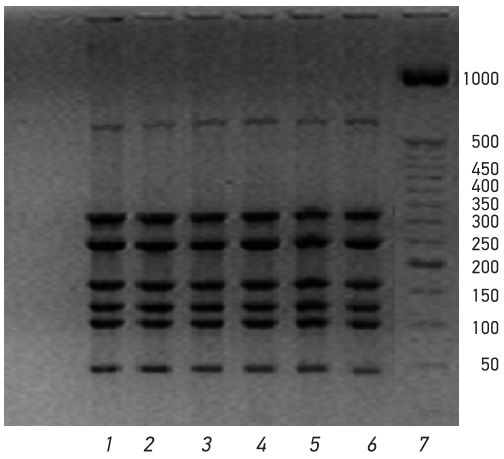

Рис. 4. Электрофореграмма продуктов амплификации при анализе серий посевного материала 1982–2006 гг. Исследуемый материал нанесен по схеме: *1* — посевная серия 367«щ» (1982); *2* — посевная серия 367«щ» (1982) в разведении 1:10; *3* — посевная серия 361«ш» (1992); *4* — посевная серия 361«ш» (1992) в разведении 1:10; *5* — посевная серия 368«щ» (2006); *6* — посевная серия 368«щ» (2006) в разведении 1:10; *7* — маркер молекулярных масс 50 bp.

исследования ДНК материала субштамма *M. bovis* BCG-1, лиофилизированного в 1948–1954 гг.

В результате проведенного исследования продемонстрирована идентичность размеров продуктов амплификации областей RD и senX3-regX3 всех исследованных образцов субштамма БЦЖ-1 ранних лиофилизатов: генерация 44в и 69б (1948), генерация 90з (1950), генерация 150м (1954). Во всех исследованных образцах были выявлены характерные для штамма БЦЖ-1 (Россия) шесть участков (472; 401; 315; 276;252; и 196 п.н., соотвествующие областям RD8; RD16; RD2; senX3-regX3; RD14 и RD1 соответственно). Картина генотипирования ранних лиофилизатов БЦЖ, использованных для производства жидкой вакцины БЦЖ (рис. 3), соответствовала картине, полученной при генотипировании субштамма *M. bovis* BCG-1, Россия (дорожки *6* и *12* на рис. 2).

При исследовании поздних посевных материалов вакцины БЦЖ — лиофилизатов посевных серий 1982–2006 гг: сер. 367«щ» (1982), сер. 361«ш» (1992), сер. 368«щ» (2006), представленных на рисунке 4, получены аналогичные данные. Анализ результатов исследования этих посевных серий показал, что все 6 участков генов, позволяющих идентифицировать испытуемый материал БЦЖ как *M. bovis* BCG-I (Россия), сохранены. В каждой посевной серии присутствуют 5 участков области RD и 1 участок повторяющихся элементов межгенной области оперона SenX3-RegX3. При разведении изучаемого материала и маркера в 10 раз получены такие же результаты.

Полученные данные генотипирования методом мультиплексной ПЦР материала вакцины БЦЖ, накопленного за 60 лет, подтверждают, что принятый в стране метод сохранения свойств *M. bovis* BCG-1 путем лиофилизации посевных серий, рассчитанных на выпуск вакцины БЦЖ в течение 10 и более лет, и ограничение числа пассажей при изготовлении коммерческих серий 4–6 пересевами обеспечивает генетическую стабильность отечественного субштамма БЦЖ.

Для оценки пригодности метода мультиплексной ПЦР при выполнении теста «Подлинность» в целях экспертизы качества вакцины БЦЖ исследовали ДНК коммерческих серий препарата отечественного производства. В результате исследований показана идентичность электрофореграмм 10 серий вакцины БЦЖ-М (по 5 серий производства «НПО «Микроген» и филиала «Медгамал» ФГБУ «ФНИЦЭМ им. Н. Ф. Гамалеи), 24 серий вакцины БЦЖ (по 10 серий производства каждого из этих предприятий) и трех посевных серий, из которых были получены коммерческие серии вакцины. Электрофореграммы коммерческих и посевных серий полностью совпадали. Исследование подтвердило присутствие в каждом изученном материале ДНК 5 участков области RD и 1 участка повторяющихся элементов межгенной области оперона SenX3-RegX3. Результаты анализа 2 коммерческих серий болгарского производства, приготовленных из субштамма *M. bovis* BCG-1, подтверждали, как и результаты исследования отечественных препаратов, идентичность штамму-продуценту, и характерные отличия от 3 зарубежных референс-субштаммов (субштамм BCG Danish 1331, субштамм BCG Tokyo, субштамм BCG Moreau RJ), которые использованы в этом эксперименте в качестве контроля.

Полученные данные позволяют рекомендовать метод мультиплексной ПЦР в качестве молекулярно-генетического метода оценки подлинности коммерческих серий вакцины БЦЖ, так как этот метод дает возможность оценить не только принадлежность штамма БЦЖ к кислотоустойчивым микобактериям, но и идентифицировать его как штамм *M. bovis* BCG-1.

Обсуждение

Существующий метод контроля вакцины БЦЖ по показателю «Подлинность» заключается в исследовании мазков лекарственного препарата вакцины БЦЖ, окрашенных на кислотоустойчивость по методу Циля-Нильсена, и по визуальному анализу характера колоний микроорганизма на среде Левенштейна-Йесена. В результате этого теста может быть сделан вывод о принадлежности бактерий к кислотоустойчивым, медленно растущим бактериям, образующим R-колонии на плотной яичной среде. На современном этапе этих данных недостаточно для подтверждения подлинности препарата, тем более принадлежности

микобактерий БЦЖ к определенному субштамму. Так, например, Японский субштамм BCG Tokyo-172, наличие двух генотипов у которого доказано в мультиплексной ПЦР, растет на агаре Миддлбрука 7H10 в виде 2 типов колоний. Генотип 1, у которого в RD 16 регионе отсутствует 22 bp участок, растет в виде R-колоний, и генотип 2, у которого подобно большинству субштаммов БЦЖ в RD 16 нет делеции участка 22 bp, растет в виде S-колоний [5, 15]. ВОЗ рекомендует для оценки коммерческих серий вакцины БЦЖ по показателю «Подлинность» использовать один из молекулярно-биологических методов [13].

При аттестации 3 субштаммов БЦЖ в международном коллаборативном исследовании был применен метод мультиплексной ПЦР с праймерами, имеющими определенную последовательность нуклеотидов. С помощью этого метода установлены характерные различия между *M. bovis* BCG Tokyo-172, *M. bovis* BCG Russian, *M. bovis* Danish 1331. Полученные в нашем исследовании данные полностью соответствовали результатам других исследователей. В соответствии с этими данными метод мультиплексной ПЦР с отечественными реактивами правомерно использовать в качестве валидированного молекулярно-генетического метода для теста «Подлинность» при проведении контроля препаратов вакцин БЦЖ при их производстве и сертификации. Этот метод позволяет оценить подлинность препарата, т.е. его идентичность отечественному субштамму БЦЖ-1 (*M. bovis* BCG-1) по наличию 5 участков области RD и 1 участку повторяющихся элементов межгенной области оперона SenX3-RegX3).

Заключение

Проведенные исследования посевных серий вакцины БЦЖ, лиофилизированных с 1948 по 2006 г., подтвердили адекватность принятой в стране системы приготовления и использования посевного материала для производства вакцины БЦЖ. Генетическая стабильность посевных серий позволяет сохранять и контролировать остаточную вирулентность штамма на постоянном уровне.

Апробированный метод мультиплексной ПЦР с отечественными реактивами может быть принят для подтверждения идентичности посевного материала и вакцины отечественному субштамму БЦЖ (*M. bovis* BCG-1) при выполнении теста «Подлинность». Метод адекватен и воспроизводим.

Литература

1. *Блум БР, Файн ПЕ. Опыт вакцинации БЦЖ: будущие вакцины против туберкулеза. В кн.: Туберкулез. Патогенез, защита, контроль. М.: Медицина; 2002. С. 575–606.*
2. *Behr MA, Wilson MA, Gill WP, Salamon H, Schoolnik GK, Rane S, et al. Comparative genomics of BCG vaccines by whole-genome DNA microarray. Science 1999; 284: 1520–3.*
3. *Behr MA, Small PM. A historical and molecular polygeny of BCG strains. Vaccine 1999; 17: 915–22.*
4. *Honda I, Seki M, Ikeda N, Yano I, Koyama A, Toida I. Identification of two subpopulations of BCG Calmette-Guerin (BCG) Tokio substrain with different RD 16 regions. Vaccine 2006; 6: 4969–74.*
5. *Talbot EA, Williams DL, Frothingham R. PCR Identification of Mycobacterium bovis BCG. J Clin Microbiol. 1997; **35**(3): 566–9.*
6. *Bedwell J, Kairo SK, Behr MA, Bygraves JA. Identification of substrains of BCG vaccine using multiplex PCR. Vaccine 2001; 19(15–16): 2146–51.*
7. *Стукова МА, Заболотных НВ, Виноградова ТИ, Гергерт ВЯ, Апт АС, Капрельянц АС, Ерохин ВВ, Яблонский ПК, Киселев ОИ. Профилактика туберкулеза: современные подходы к разработке противотуберкулезных вакцин. Вестник РАМН, Актуальные вопросы фтизиатрии 2012; (11): 45–52.*
8. *Milstein JB, Gibson JJ. Quality control of BCG vaccine by WHO: a review of factors that may influence vaccine effectiveness and safety. WHO Bulletin OMS 1990; **68**(1): 93–108.*
9. *Trovero A, Arguelles C, Cataldi A. Preparation of a working seed lot of BCG and quality control by PCR genotyping. Revista Argentina de Microbiologia 2010; 42: 4–10.*
10. *Лещинская ЕН, Вакенгут АМ. Условия длительного сохранения вакцины БЦЖ. Проблемы туберкулеза 1941; (3): 63–6.*
11. *Лещинская ЕН, Вакенгут АМ. Дальнейшее изучение сухой глюкозной вакцины БЦЖ. Проблемы туберкулеза 1942, (5–6): 47–50.*
12. *WHO Technical Report Series. № 977, 60 report, 2013, 16–8.*
13. *Markey K, Ho MM, Choudhury B, Seki M, Ju L, Luiz RR, Castello-Branco LR, Gairola S, Zhao A, Shibayama K, Andre M, Corbel MJ. Report of an collaborative study to evaluate the suitability of multiplex PCR as an identity assay for different sub-strains of BCG vaccine. Vaccine 2010; 28: 6964–9.*
14. *Wada T, Maruyama F, Iwamoto T, Maeda S, Yamamoto T, Nakagawa I, Yamamoto S, Ohara N. Deep sequencing analysis of the heterogeneity of seed and commercial lots of the bacillus Calmette-Guŭrin (BCG) tuberculosis vaccine substrain Tokyo-172. Available from: www.natura.com/Scientificreports | 5:17827 | DOI: 10.1038 / srep17827 (2015); 1–9.*

Об авторах

Федеральное государственное бюджетное учреждение «Научный центр экспертизы средств медицинского применения» Министерства здравоохранения Российской Федерации. Российская Федерация, 127051, Москва, Петровский бульвар, 8, стр. 2.

Леви Диана Тимофеевна. Главный эксперт Управления экспертизы противобактериальных МИБП Центра экспертизы и контроля МИБП, д-р мед. наук, профессор.

Обухов Юрий Иванович. Начальник Управления экспертизы противобактериальных МИБП Центра экспертизы и контроля МИБП.

Александрова Наталья Владимировна. Главный эксперт лаборатории противобактериальных вакцин Испытательного центра экспертизы качества МИБП, канд. мед. наук.

Волкова Рауза Асхатовна. Начальник лаборатории молекулярно-биологических и генетических методов испытаний Испытательного центра экспертизы качества МИБП, д-р биол. наук.

Эльберт Елизавета Викторовна. Ведущий эксперт лаборатории молекулярно-биологических и генетических методов испытаний Испытательного центра экспертизы качества МИБП, канд. биол наук.

Федеральное бюджетное учреждение науки «Центральный научно-исследовательский институт эпидемиологии» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека. Российская Федерация, 111123, Москва, ул. Новогиреевская, дом 3а.

Альварес-Фигероа Мария Викторовна. Руководитель научной группы разработки новых методов диагностики туберкулеза отдела молекулярной диагностики и эпидемиологии, канд. мед. наук.

Прокопенко Анастасия Викторовна. Младший научный сотрудник.

Луданный Руслан Игоревич. Ведущий научный сотрудник, канд. биол. наук.

Адрес для переписки: Леви Диана Тимофеевна; Levi@expmed.ru

Identity and stability assessment of BCG vaccine by multiplex PCR

D. T. Levi[1], Yu. I. Obukhov[1], N. V. Aleksandrova[1], R. A. Volkova[1], E. V. Elbert[1], M. V. Alvarez Figeroa[2], A. V. Prokopenko[2], R. I. Ludanniy[2]

[1] *Federal State Budgetary Institution «Scientific Centre for Expert Evaluation of Medicinal Products» of the Ministry of Health of the Russian Federation, Moscow, Russia*
[2] *Federal Budget Institution of Science «Central Epidemiology Scientific and Research Institute», Moscow, Russia*

Multiplex polymerase chain reaction method was used to assess the stability of 7 seed lots of a substrain Mycobacterium bovis BCG-1, Russia, used for the manufacture of BCG vaccine since 1948 till present. For performng PCR we used primers, matching 5 parts of the RD field and 1part of repeating elements of intergenic operon senX3-regX3 region. Electrophoregrams of amplification products for 7 seed lots of products were identical and differed from the electrophoregrams of other known BCG substrains used as control samples. Similar results were obtained for genotyping of 32 commercial lots of BCG vaccine, manufactured using substrain M. bovis BCG-1 by three Russian manufacturers. The obtained data confirmed the stability of seed lots of BCG vaccine used for more than 60 years, and the adequacy of the settled system of strain maintanance. The assessed method of multiplex PCR with domestic reagents can accepted for confirming that the seed and the vaccine are identical to domestic BCG vaccine substrain (M. bovis BCG-1) when performing «Identification» test. The mehod is adequate and reproducible.

Key words: *seed lot; multiplex polymerase reaction; BCG substrains; stability; identity.*

For citation: *Levi DT, Obukhov YuI, Aleksandrova NV, Volkova RA, Elbert EV, Alvarez Figeroa MV, Prokopenko AV, Ludanniy RI. Identity and stability assessment of BCG vaccine by multiplex PCR. BIOpreparations. Prevention, Diagnosis, Treatment 2016; 16 (1): 49–54.*

References

1. *Bloom BR, Fine PE. Previous BCG vaccination: future vaccine against tuberculosis. In: Tuberculosis. Pathogenesis, protection and control. Moscow: Meditsina; 2002. P. 575–606 (in Russian).*
2. *Behr MA, Wilson MA, Gill WP, Salamon H, Schoolnik GK, Rane S, et al. Comparative genomics of BCG vaccines by whole-genome DNA microarray. Science 1999; 284: 1520–3.*
3. *Behr MA, Small PM. A historical and molecular polygeny of BCG strains. Vaccine 1999; 17: 915–22.*
4. *Honda I, Seki M, Ikeda N, Yano I, Koyama A, Toida I. Identification of two subpopulations of BCG Calmette-Guerin (BCG) Tokio substrain with different RD 16 regions. Vaccine 2006; 6: 4969–74.*
5. *Talbot EA, Williams DL, Frothingham R. PCR Identification of Mycobacterium bovis BCG. J Clin Microbiol. 1997; **35**(3): 566–9.*
6. *Bedwell J, Kairo SK, Behr MA, Bygraves JA. Identification of substrains of BCG vaccine using multiplex PCR. Vaccine 2001; 19(15–16): 2146–51.*
7. *Stukova MA, Zabolotnyh NV, Vinogradova TI, Gergert VYa, Apt AS, Kaprelyants AS, Erohin VV, Yablonskiy PK, Kiselev OI. Tuberculosis prevention: modern approaches to the development of TB vaccines. Vestnik RAMN, Aktualnye voprosy ftiziatrii 2012; (11): 45–52 (in Russian).*
8. *Milstein JB, Gibson JJ. Quality control of BCG vaccine by WHO: a review of factors that may influence vaccine effectiveness and safety. WHO Bulletin OMS 1990; **68**(1): 93–108.*
9. *Trovero A, Arguelles C, Cataldi A. Preparation of a working seed lot of BCG and quality control by PCR genotyping. Revista Argentina de Microbiologia 2010; 42: 4–10.*
10. *Leschinskaya EN, Vakengut AM. Terms of long-term storage of BCG vaccine. Problemy tuberkuleza 1941; (3): 63–6 (in Russian).*
11. *Leschinskaya EN, Vakengut AM. Further study of the dry glucose BCG vaccine. Problemy tuberkuleza 1942, (5–6): 47–50 (in Russian).*
12. *WHO Technical Report Series. № 977, 60 report, 2013, 16–8.*
13. *Markey K, Ho MM, Choudhury B, Seki M, Ju L, Luiz RR, Castello-Branco LR, Gairola S, Zhao A, Shibayama K, Andre M, Corbel MJ. Report of an collaborative study to evaluate the suitability of multiplex PCR as an identity assay for different sub-strains of BCG vaccine. Vaccine 2010; 28: 6964–9.*
14. *Wada T, Maruyama F, Iwamoto T, Maeda S, Yamamoto T, Nakagawa I, Yamamoto S, Ohara N. Deep sequencing analysis of the heterogeneity of seed and commercial lots of the bacillus Calmette-Guŭrin (BCG) tuberculosis vaccine substrain Tokyo-172. Available from: www.natura.com/Scientificreports | 5:17827 | DOI: 10.1038 / srep17827 (2015); 1–9.*

Authors

Federal State Budgetary Institution «Scientific Centre for Expert Evaluation of Medicinal Products» of the Ministry of Health of the Russian Federation, 8-2 Petrovsky Boulevard, Moscow, 127051, Russian Federation.
Levi DT. Chief expert of Office of expertise of antibacterial medical immunobiological preparations of Center of expertise and control of medical immunobiological preparations. Doctor of Medical Sciences, professor.
Obuhov YuI. Head of Office of expertise of antibacterial medical immunobiological preparations of Center of expertise and control of medical immunobiological preparations.
Aleksandrova NV. Chief expert of Laboratory of bacterial vaccines of Test Center of Quality Expertise of medical immunobiological preparations. Candidate of Medical Sciences.
Volkova RA. Head of the laboratory of molecular biology and genetic testing methods of Test Center of Quality Expertise of medical immunobiological preparations. Doctor of Biological Sciences.
Elbert EV. Leading expert of the laboratory of molecular biology and genetic testing methods of Test Center of Quality Expertise of medical immunobiological preparations. Candidate of Biological Sciences.

Federal Budget Institution of Science «Central Research Institute for Epidemiology» of Federal Service for Supervision of Consumer Rights Protection and Human Welfare, 3a Novogireevskaya street, Moscow, 111123, Russian Federation.
Alvares-Figeroa MV. Head of the research group to develop new methods for diagnosis of tuberculosis of department of molecular diagnostics and epidemiology. Candidate of Medical Sciences.
Prokopenko AV. Junior researcher.
Ludannyi RI. Leading researcher. Candidate of Biological Sciences.